Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article

Vol. 36, No. 4, Winter 2023, p. 413-422

Cloning and Phylogenetic Analysis of Iranian Isolates of *Narcissus Latent Virus* Based on Sequence of 3´ Region of Genome

Z. Moradi[1], M. Mehrvar[2*]

Received: 21-08-2022
Revised: 10-10-2022
Accepted: 12-10-2022
Available Online: 30-01-2023

How to cite this article:
Moradi, Z., & Mehrvar, M. (2023). Cloning and Phylogenetic Analysis of Iranian Isolates of *Narcissus Latent Virus* Based on Sequence of 3´ Region of Genome. *Journal of Iranian Plant Protection Research 36*(4): 413-422. (In Persian with English abstract)
DOI: 10.22067/jpp.2022.78357.1101

Introduction

Iris spp. is reported to be affected by several viruses in the family *Potyviridae* including iris mild mosaic virus (IMMV), iris severe mosaic virus (ISMV), iris fulva mosaic virus, bean yellow mosaic virus (BYMV), turnip mosaic virus (TuMV), ornithogalum mosaic virus (OrMV), narcissus latent virus (NLV), butterfly flower mosaic virus (BFMV), and gladiolus mosaic virus (tentative name). *Narcissus latent virus* (NLV) is a member of the genus *Macluravirus* in the family *Potyviridae.* It has non-enveloped flexuous filamentous virions of 657 nm long and 13 nm wide, which encapsidate a single-stranded, positive-sense RNA molecule of approximately 8,000 nt long. NLV is distributed widely throughout the major planting areas of Japan, New Zealand, and European countries. It is one of the most common viruses infecting narcissus, iris, gladiolus, and nerine, causing significant yield losses and quality deterioration in their bulbs and flowers. Due to the presence of asymptomatic infection of NLV in iris and narcissus, the relevance of its infection in host plants may be severely underrated. As Khorasan Razavi province is one of the major producing areas of ornamental plants in Iran, identification of this virus is a concern. In this study, we attempted to identify NLV infecting iris plants and compare Iranian NLV isolates with other sequences from different geographical regions to provide the first detailed information of phylogenetic characterization of this virus in Iran.

Materials and Methods

Iris leaf samples showing virus-like symptoms of leaf chlorosis and mosaic were collected from field-grown plants in Khorasan Razavi province. Total RNA was extracted from the field samples using Promega SV Total RNA Isolation Kit (USA). Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using specific primer pair CPU-F (5´-CATTACACCCGACCTGGAACT-3´) and CPU-R (5´-CCATTTCAGGGCATTGGAGGA-3´), which were designed to amplify a 1066 bp fragment of the 3´-region of NLV genome (encompassing partial NIb (25 nt), complete CP (894 nt), and partial 3'UTR (147 nt)). PCR products and DNA ladder were separated by agarose gel electrophoresis, visualized using DNA Green viewer staining, and photographed with ultraviolet-illumination. Amplified fragments of the expected size were purified, cloned into pTG19-T vector and bi-directionally sequenced. Obtained sequences were phylogenetically compared with the corresponding isolates available in the GenBank after multiple alignments. The phylogenetic tree was constructed based on the nucleotide sequences of the CP-UTR using the neighbor-joining method by MEGA11.

Results and Discussion

Amplification product (1066 bp) was obtained from five infected samples, but not from healthy samples. The

1- Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: mehrvar@um.ac.ir)

most typical symptoms in positive samples were mosaic, and interveinal chlorosis. Three selected PCR positive samples were cloned into the pTG19-T vector and sequenced. BLASTn analysis of the sequenced data revealed that the PCR-amplified fragments belonged to NLV. Three selected isolates which are referred to as IR, IR2, and IR3 were deposited in GenBank. The previously identified and conserved amino acid sequence motifs described in CP of macluraviruses were present in Iranian CP sequences. The phylogenetic tree placed the NLV sequences into two distinct phylogroups I and II; the Iranian isolates clustered together with isolates from Poland, New Zealand, and United Kingdom into group II. Phylogenetic analysis showed that Iranian isolates shared 77.47 to 98.12% nucleotide sequence identity and 77.70-99.34% amino acid sequence identity with other isolates of NLV. Also, identity of these three isolates in the nucleotide and amino acid levels ranged between 97 to 97.84% and 97.38 to 99.02%, with each other, respectively. Iranian isolates showed the highest nucleotide sequence identity with NLV5_1 isolate (JX270766) from Poland (between 97.65 to 98.12 %) and the lowest with NLV3 isolate (JX270762) from Poland (between 77.47 to 77.95 %).

Conclusion

NLV is a major constraint to iris and narcissus production worldwide. The phylogenetic analysis showed a low correlation between genetic and geographic distances which further emphasizing the importance of the exchange and use of virus-free propagating organs in preventing the dissemination of this virus. It seems that contaminated vegetative organs from some European countries (e.g. Netherlands), which are the major producer and the largest exporters of flowers and ornamentals in the world, can play a significant role in the worldwide distribution of the virus. Identification and the use of more isolates are recommended for a better understanding of the genetic structure and variation of NLV populations on a large geographical scale. The data obtained in this study will be beneficial to improve control strategies for this virus in Iran.

Keywords: Cloning,CP-UTR, Iran, *Narcissus latent virus*, Phylogenetic analysis

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱، ص. ۴۲۲-۴۱۳

همسانه‌سازی و بررسی تبارزایی جدایه‌های ایرانی *narcissus latent virus* براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ۳′ ژنوم

زهره مرادی[۱]- محسن مهرور[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۰

چکیده

ویروس نهفته نرگس (*narcissus latent virus*, NLV) یکی از بیمارگرهای بسیار مهم و خسارت‌زای ارقام تجاری گیاه نرگس و زنبق در سراسر جهان می‌باشد. به منظور شناسایی این ویروس، گیاهان زنبق با علائم مشکوک ویروسی از شمال شرق کشور جمع‌آوری و ناحیه ۳´ ژنوم آنها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با روش رونویسی معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) تکثیر و همسانه‌سازی شد. ناحیه CP-UTR این جدایه‌ها (سه جدایه) به همراه تعدادی از ترادف‌های جدایه‌های موجود در بانک ژن (۲۴ جدایه) مقایسه و پس از انجام همردیف‌سازی چندگانه، مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفتند. جدایه‌های مورد مقایسه در درخت فیلوژنتیکی در دو گروه جداگانه قرار گرفتند (I و II) و جدایه‌های ایرانی در کنار جدایه‌هایی از لهستان، نیوزیلند، و بریتانیا در گروه II قرار گرفتند. مقایسه درصد مشابهت ژنتیکی نشان داد که جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های NLV بین ۷۷/۴۷ تا ۹۸/۱۲ درصد در سطح نوکلئوتیدی مشابهت دارند که به ترتیب بیشترین میزان شباهت (بین ۹۷/۶۵ تا ۹۸/۱۲ درصد) با جدایه NLV5_1 (JX270766) از لهستان و کمترین (بین ۷۷/۴۷ تا ۷۷/۹۵ درصد) با جدایه NLV3 (JX270762) از لهستان بود. همچنین تشابه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی سه جدایه ایرانی با یکدیگر به ترتیب ۹۷/۸۴-۹۷ و ۹۹/۰۲-۹۷/۳۸ درصد تعیین گردید. میزان تنوع نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR بین جدایه‌های NLV، ۰/۱۳۰ به دست آمد که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالای این ویروس در این ناحیه از ژنوم است. نتایج پژوهش حاضر می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی مولکولی برای تولید ارقام مقاوم به ویروس مفید بوده و خسارت ناشی از بیماری را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز تبارزایی، ناحیه CP-UTR، ویروس نهفته نرگس، همسانه‌سازی، ایران

مقدمه

بیش از ۳۰۰ نوع زنبق وحشی در دنیا وجود دارد که از این تعداد حدود ۲۰ گونه و زیرگونه آن در ایران گزارش شده‌اند (Attari *et al.*, 2016). *Iris* بزرگترین جنس از خانواده Iridaceae، دارای بیش از ۲۶۰ گونه و زیرگونه علفی چندساله است (Naseri *et al.*, 2022).

گونه‌های زنبق (*Iris* sp.) دارای توزیع جهانی هستند و به طور گسترده ای در سراسر دنیا در شرایط اقلیمی مختلف انتشار دارند. این گیاهان ارزش زینتی و دارویی زیادی دارند و پیکره رویشی و ریشه آنها برای رفع و تسکین بسیاری از بیماریها موثر است (Rahmana *et al.*, 2003). گونه‌های مختلف زنبق میزبان تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی هستند که برخی از آنها دارای اهمیت اقتصادی بوده و تعدادی دارای اهمیت بالقوه هستند. تاکنون چندین ویروس آلوده کننده گونه‌های زنبق از نقاط مختلف جهان گزارش شده است، از جمله: *iris severe mosaic virus*، *iris mild mosaic virus*، *iris fulva mosaic virus*، *bean yellow mosaic virus*، *turnip mosaic virus*، *ornithogalum mosaic virus*، *narcissus latent virus*، *butterfly flower mosaic virus* و *gladiolus*

۱- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: mehrvar@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/jpp.2022.78357.1101

mosaic virus (Brunt, 1977؛ Kulshrestha *et al.*, 2006a ; Van der Vlugt *et al.* ؛2006b, Barnett and Alper ؛ 1993; 1977؛ Barnett, 1991؛ Hammond *et al.*, 1985؛ Inouye and Mitsuhata, 1978؛ Wei *et al.*, 2006؛ 2007Wylie *et al.*, ؛ 2019؛ Chen *et al.* 2008 ؛, Derks *et al.*, 1985؛ Asjes, 1979). *Narcissus latent virus* (NLV) متعلـق بـه جـنس *Macluravirus* از خانواده Potyviridae است. پیکره این ویـروس رشته‌ای شکل، انعطاف‌پذیر، فاقد غشا و دارای طول ۶۵۷ و عرض ۱۳ نانومتر می‌باشد. ژنوم آن از یک مولکول اسید ریبونوکلئیک تک‌رشـته مثبت به طول تقریبـی ۸۰۰۰ نوکلئوتیـد تشـکیل شـده اسـت کـه در انتهای '۳ دارای polyA و در انتهای '۵ دارای vpg می‌باشد (King *et al.*, 2012). NLV یکی از مهمترین ویروس‌هـای ارقـام تجـاری گیاه نرگس در سراسر جهان مـی‌باشـد (Clark and Brunt, 1977 ; Guy, 2000) که باعث کاهش عملکـرد قابـل توجـه و پـایین آمـدن کیفیت پیازها و گـل‌هـای ایـن گیـاه مـی‌شـود (Jin *et al.*, 2017 ; Wylie and Jones, 2012; Ohshima *et al.*, 2016). همچنـین این ویروس بطور پراکنده در سایر گیاهان پیازدار مثل زنبـق، گلایـول (*Gladiolus communis* L.) و نرین (*Nerine sarniensis* L.) نیز آلودگی ایجاد می‌کنـد (Wei Brunt, 1977; Derks *et al.*, 1985 ; *et al.*, 2007). ویروس مذکور از طریق مکانیکی و همچنـین توسـط چنـدین گونـه شـته از جملـه *Acyrthosiphon pisum*، *Aphis gossypii* و *Myzus persicae* بـا رابطـه ناپایا منتقـل مـی‌گـردد (Brunt, 1977). NLV در آلودگی منفرد سبب ایجـاد کلـروز خفیـف برگ یا کلروز موقت در نوک برگ ارقام حساس می‌شود، و در گیاهان نرگسی که به طور طبیعی آلوده شده‌اند، معمولاً باعث عفونت جزئی یا حتی بدون ایجاد نشانه خاصی خواهد شد. این گمان وجـود دارد کـه این ویروس در آلودگی مخلوط با دیگر ویروسها، سبب تشدید علائـم آنها می شـود (Brunt, 1977, Derks *et al.*, 1985 ,). NLV بـرای اولین بار در سال ۱۹۶۶ از روی گیاهان نـرگس در بریتانیـا ردیـابی و توصیف شد (Brunt and Atkey, 1967). پس از آن برانت در سـال ۱۹۷۷ به توصیف برخی از میزبان‌های این ویروس پرداخت و ویژگی-های مورفولوژیکی و فیزیکوشیمیایی جدایه‌هایی از نرگس و پیاز زنبق آلوده را تعیین نمـود (Brunt, 1977). برنیـک و همکـاران بخشـی از ژنوم این ویـروس را براسـاس تکنیـک one-step RT-PCR تعیـین نمودنـد (Berniak *et al.*, 2013). گـائو و همکـاران در سـال ۲۰۱۸ برای اولین بار ژنوم کامل این ویروس را از روی گیاه نرگس در هلنـد گزارش نمودند (Gao *et al.*, 2018). این ویروس به طـور وسـیعی در سراسر مناطق اصلی کشت در کشـورهای اروپـایی، ژاپـن، و نیوزیلنـد گسـترش دارد (Berniak *et al.*, 2013; Ohshima *et al.*, 2016 ; Wei *et al.*, 2007). اخیرا NLV در ایـران بـرای اولـین بـار از روی گیاه زنبق در استان خراسان رضوی که یکی از مناطق عمده کشـت و تولید گیاهان زینتی در کشور می باشد، گزارش گردید (Moradi and Mehrvar, 2022). با در نظر داشتن حضور این ویـروس در ایـران و با فرض اینکه خصوصیات مولکولی جدایه‌های مختلف NLV متفاوت می‌باشد، شناخت جدایه‌ها و نژادهـای ایـن ویـروس و بررسـی تنـوع ژنتیکی واریانتهای مختلـف آن مـی‌توانـد راهگشـای درک تکامـل و توسعه بیمارگر و در نتیجه ارائه راهکار موثر برای کنترل آن‌هـا باشـد. برای تشخیص و تعیین سویه‌های بسـیاری از اعضـای پـوتی‌ویریـده، اغلب پژوهشگران دنیا از آنالیز ترادف نوکلئوتیدی ناحیه '۳ ژنوم، یعنی CP-UTR اسـتفاده کـرده‌انـد (Adams *et al.*, 2005; Moradi *et* ; Farahbakhsh *et al.*, 2013; *al.*, 2017a). آنالیزهـای فیلـوژنی جنس‌های خانواده پوتی‌ویریده نشان داد که استفاده از توالی ناحیه -'3 UTR و پروتئین پوششی برای شناسایی گونه‌ها و اسـترین‌هـا بسـیار مناسب است (Berger *et al.*, 1997). از آنجایی که تاکنون تحقیقات بسیار محدودی بر روی این ویروس انجام گرفته، لذا هـدف از انجـام پژوهش حاضر بررسـی خصوصـیات تبـارزایی جدایـه‌هـای ایرانـی بـا استفاده از آنالیز مولکولی ناحیـه CP-UTR و مقایسـه آنهـا بـا سـایر جدایه‌های دنیا و همچنین ارتباط احتمالی موجود بین تنوع ژنتیکـی و مناطق جغرافیایی در جهت ارایه راه‌کارهای مناسب مدیریتی است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های آلوده و استخراج RNA

نمونه‌برداری از بافت برگی گیاهـان زنبـق (*Iris versicolor* L.) مشکوک به آلودگی ویروسی از گلخانه‌ها و مناطق کاشـت ایـن گیـاه براساس علائم بیان شده برای ویروس مـذکور (از جملـه موزاییـک و رنگ پریدگی) انجام گردید. استخراج اسید ریبونوکلئیک کـل از بافـت گیـاهی آلـوده بـا اسـتفاده از کیـت SV Total RNA Isolation System (Promega, USA) مطـابق دسـتورالعمل شـرکت سـازنده انجام شد. تعیین غلظـت و کیفیـت RNA اسـتخراجی بـا اسـتفاده از بررسی نسبت جذب‌های نوری ۲۶۰ و ۲۸۰ نـانومتر (A260/280) بـا استفاده از نانودراپ و نیز از طریق بارگذاری نمونـه‌هـا روی ژل آگـارز یک درصد در الکتروفورز انجام گردید.

طراحی آغازگرهای اختصاصی و انجام واکـنش زنجیـره‌ای پلیمراز با نسخه‌برداری معکوس (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 انجام و به کمک Primer-BLAST قابل دسترس از NCBI اختصاصیت آنهـا تاییـد گردیـــد. آغازگرهـــای طراحـــی شـــده مســـتقیم CPU-F (5´-CATTACACCCGACCTGGAACT-3´) و معکوس CPU-R (5´-CCATTTCAGGGCATTGGAGGA-3´) قطعـــه ای بـــه

طول ۱۰۶۶ جفت باز را که شامل ناحیه 3´-UTR، طول کامل ژن کدکننده پروتئین پوششی (CP)، بعلاوه بخشی از انتهای ´۳ ژن NIb می باشد را تکثیر می‌کنند. برای ساخت رشته مکمل (cDNA)، سه میکرولیتر از آر. ان. ای. کل استخراج شده با دو میکرولیتر از آغازگر اختصاصی معکوس (CPU-R) و هشت میکرولیتر آب دیونیزه استریل مخلوط و میکروتیوب در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه قرار داده شد. سپس دو میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، چهار میکرولیتر بافر ۵X واکنش و یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌بردار معکوس (MMuLV Reverse Transcriptase) (پارس‌توس، ایران) به مخلوط اضافه گردیده (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) و میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ °C ترموسایکلر قرار داده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده CPU-F و CPU-R و مخلوط آماده PCR (Taq DNA Polymerase Master Mix Red-Ampliqon) انجام شد. برای انجام این آزمون، سه میکرولیتر از cDNA ساخته شده به عنوان الگو، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس (هریک به غلظت ۱۰ پیکومول) و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط آماده Master PCR Mix Red با هم ترکیب شدند، در نهایت به وسیله آب مقطر استریل حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک چرخه در دمای ۹۴°C به مدت سه دقیقه و ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه در دمای °C ۷۲ به مدت هفت دقیقه با استفاده از ترموسایکلر انجام گردید. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی دو میکرولیتر از Green viewer (سیناکلون، ایران)، الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داکیومنت (Syngene GeneFlash, UK) عکس‌برداری شد.

همسانه‌سازی و توالی‌یابی قطعات تکثیر شده

باندهای تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، قبل از همسانه‌سازی به درون ناقل، با استفاده از کیت Gel Extraction kit (DENAzist, Iran) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل آگارز خالص‌سازی شدند. همسانه‌سازی با استفاده از pTG19-T PCR Cloning Vector (Vivantis, Malaysia) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده در ناقل پلاسمیدی pTG19-T و استرین DH5α باکتری *Escherichia coli* و به وسیله شوک حرارتی انجام شد.

پس از عمل انتقال، دو نوع پرگنه سفید و آبی رنگ بر روی محیط کشت تشکیل گردید. به منظور تشخیص و تایید همسانه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (پرگنه‌های سفید) واکنش Colony PCR با استفاده از آغازگرهای M13 انجام گرفت. دی.ان.ای پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از Plasmid DNA isolation Kit (DENAzist, Iran) مطابق دستورالعمل شرکت استخراج شد. غلظت پلاسمید استخراج شده‌ی حاوی قطعه مورد نظر با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری گردید. مقدار ۲۰ میکرولیتر پلاسمید با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر، جهت تعیین توالی با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

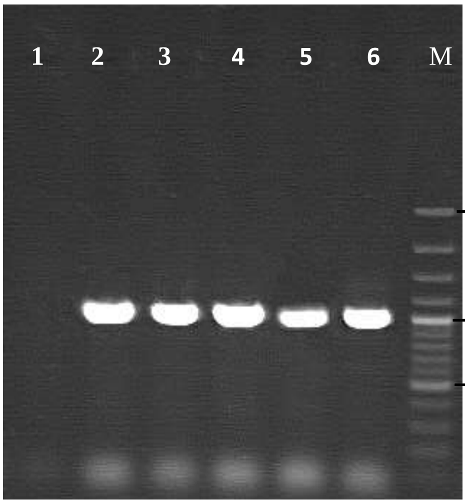
در ابتدا با شناسایی توالی مربوط به پلاسمید و همردیف‌سازی آن با توالی‌های به دست آمده، ناحیه مربوط به پلاسمید حذف و توالی‌ها خالص‌سازی شدند. سپس با برنامه BLASTn موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI صحت توالی‌ها، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین هم‌ردیف‌سازی چندتایی توالی‌ها با یکدیگر و نیز با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن، با استفاده از الگوریتم Muscle موجود در نرم-افزار MEGA11 انجام شد. در این آنالیز، توالی ویروس نهفته آرتیشو (KF155694؛ Artichoke latent virus) به عنوان Outgroup بکار گرفته شد. ماتریس درصد شباهت بین جدایه‌های NLV با استفاده از نرم‌افزار Sequence Demarcation Tool (SDT) v. 1.2 ترسیم شد. به منظور بررسی امکان وقوع نوترکیبی از نرم‌افزار RDP استفاده گردید. فاصله ژنتیکی (Genetic distance) و تنوع نوکلئوتیدی (Nucleotide diversity, π) بین ترادف‌ها و گروههای فیلوژنتیک با مدل Kimura 2-parameter در نرم‌افزار MEGA11 محاسبه گردید. همچنین نسبت جانشینی نامترادف (Nonsynonymous substitution) بر جانشینی مترادف (Synonymous substitution) در آمینواسیدها، که تخمین مناسبی از فشار انتخاب (Selective pressure) در سطح پروتئین به دست می دهد با استفاده از همان نرم‌افزار تعیین گردید. درخت تبارزایی به روش Neighbor joining به وسیله برنامه MEGA11 و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap) ترسیم گردید (Tamura *et al.*, 2021). همچنین برای بررسی توالی‌های آمینواسیدی، توالی های نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 به توالی‌های آمینواسیدی تبدیل شد و سپس با استفاده از ابزار جستجوی Pfam در سایت EMBL-EBI نواحی حفاظت شده آمینواسیدی برای هرکدام از توالی‌ها جستجو شد.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری طیف جذبی نمونه‌ها با نانودراپ نشان داد که RNA کل استخراج شده دارای غلظت مناسبی بین ۱۷۰ الی ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بوده و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در آنها بین ۱/۹۵ الی ۲/۱۴ می‌باشد. واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای

اختصاصی، منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۰۶۶ جفت باز در پنج نمونه آلوده شد در حالیکه در نمونه گیاه سالم هیچ باندی مشاهده نشد (شکل ۱).

نتایج حاصل از جستجو با ابزار BLAST در پایگاه داده‌های NCBI برای توالی‌های به دست آمده، صحت توالی‌های مذکور را نشان داد و تاییدکننده آلودگی گیاهان زنبق به ویروس نهفته نرگس بود. همچنین حضور موتیف‌های حفاظت شده در این توالی‌ها تایید دیگری بر صحت توالی‌های به دست آمده بود. قطعات تعیین ترادف شده شامل قسمتی از نیمه ´۳ ژن NIb (۲۵ نوکلئوتید)، کل ژن CP (۸۹۴ نوکلئوتید)، و ناحیه ترجمه نشدنی ´۳ (3´-UTR) (۱۴۷ نوکلئوتید) بود. ترادف نوکلئوتیدی ۱۰۶۶ جفت‌بازی سه جدایه NLV به نام‌های IR، IR2 و IR3 در بانک ژن با شماره‌های دسترسی OP056418، OM304330 و OP056419 ثبت شد.



شکل ۱- الکتروفورز محصول RT-PCR (قطعه تکثیر شده ۱۰۶۶ جفت باز) در ژل آگارز یک درصد با جفت آغازگر اختصاصی (CPU-F/CPU-R) مربوط به جدایه‌های مختلف NLV (راهک‌های ۲ تا ۶)، راهک ۱: کنترل منفی با گیاه سالم، ستون M نشانگر DNA (100bp)

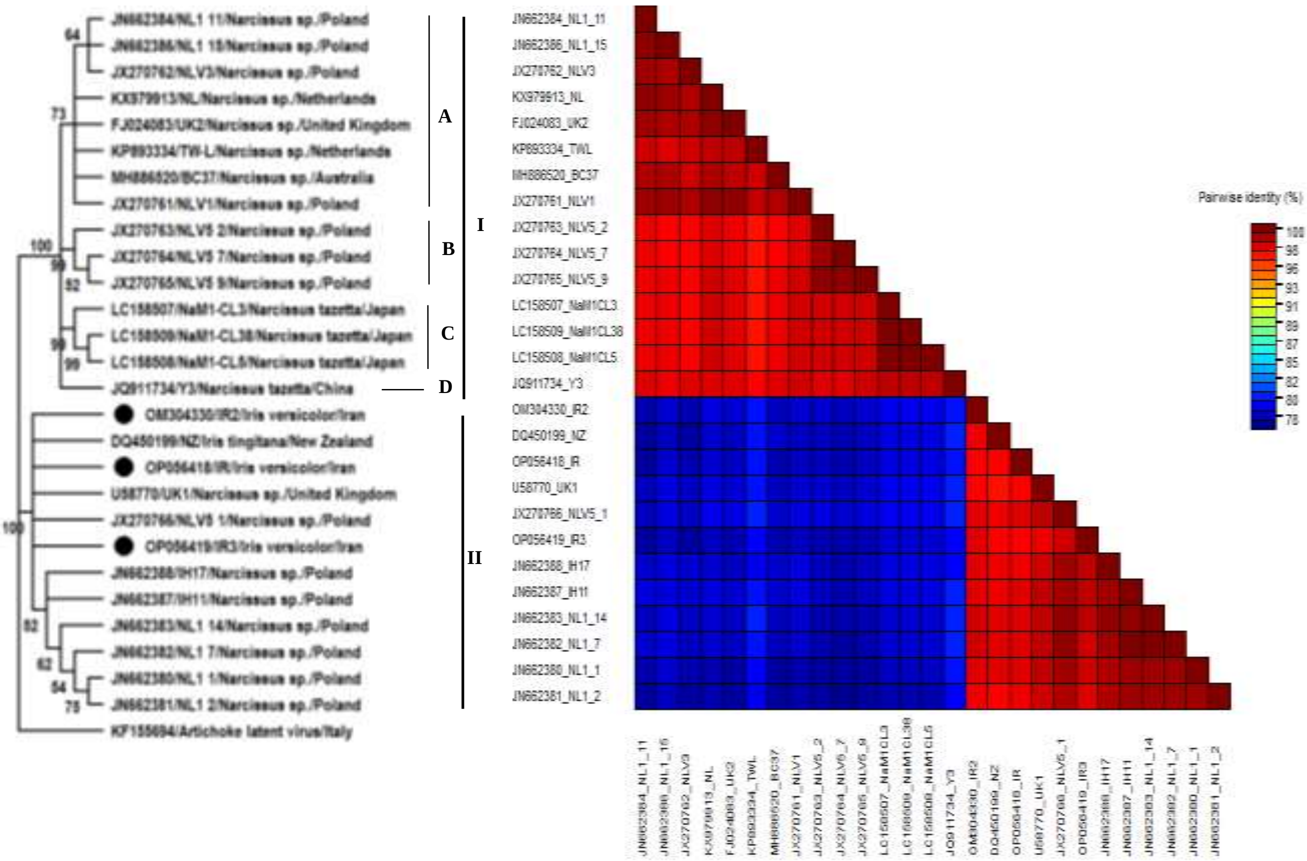
Figure 1- 1% agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of NLV amplification using specific primers (CPU-F/CPU-R). Lane 1: healthy iris plant (negative control); Lane 2-6: NLV infected samples from Khorasan Razavi; M: 100bp DNA marker

کدون خاتمه چهارچوب خوانش (ORF) پلی پروتئین ویروس در انتهای ژن CP در سه جدایه ایرانی و نیز اکثر جدایه‌های مورد بررسی TGA و در تعدادی TAA بود. سایت برشی احتمالی CP با NIb، در جدایه‌های ایرانی و نیز اکثر جدایه‌های مورد بررسی TPDLELQ/M و در برخی TPSLELQ/M بود. پروتئین پوششی ویروس از ۲۹۷ آمینواسید تشکیل شده و موتیف‌های GTSP، WCANNGTSSE، AFDY، QSKAAA که مشخصه اعضای جنس پوتی‌ویروس هستند در ترادف‌های به دست آمده از ژن CP جدایه‌های NLV مشاهده شدند (Moradi *et al.*, 2017b). موتیف تری پپتیدی حفاظت شده DAG که در انتقال با شته دخالت دارد (Atreya *et al.*, 1995) در جدایه‌های NLV وجود نداشت. به طور معمول موتیف DAG در یک بلوک هپتاپپتیدی در یا نزدیک انتهای آمینی (N-terminus) پروتئین پوششی پوتی‌ویروس‌های قابل انتقال با شته یافت می‌شود (Atreya *et al.*, 1990; 1995). با این‌حال در جدایه های مورد بررسی NLV، دو موتیف شبیه به DAG یعنی DVG و DVE مستقیماً بعد از محل برش CP با NIb یافت شدند. با توجه به اینکه در تمام جدایه‌های NLV این دو تری‌پپتید مستقیماً پس از مکان برش یافت می‌شوند (یعنی در موقعیت دو تا پنج توالی آمینواسیدی CP)، بنابراین احتمالاً بخشی از موتیف هپتاپپتیدی ذکر شده را تشکیل نمی‌دهند؛ همانطور که بگی و همکاران (Badge *et al.*, 1997) به این موضوع اشاره نمودند.

مطالعات گذشته نشان داده که یک جهش از DAG به DAE در پوتی ویروس‌هایی مثل Tobacco vein mottling virus یا Maclura mosaic virus باعث از دست رفتن قابلیت انتقال ویروس توسط ناقل شده؛ همچنین تبدیل DAG به DVG باعث کاهش چشمگیر عملکرد انتقال گردید (Aterya *et al.*, 1990; 1995; Badge *et al.*, 1997). تحقیقات دیگر نشان داد که چندین پوتی ویروسی که توسط شته‌ها منتقل می‌شوند حاوی موتیف DAG نیستند (Wylie *et al.*, 2002; Nigam *et al.*, 2019). از سوی دیگر، همه پوتی ویروس‌های دارای این موتیف الزاما توسط شته قابل انتقال نیستند و تغییرات خاصی در DAG توسط ویروس تحمل می‌شود (Johansen *et al.*, 1996; Lopez-Moya et al., 1999; Ateka *et al.*, 2017; Flasinski and Cassidy, 1998). از اینرو قابلیت انتقال با شته در جدایه های NLV نیاز به بررسی آزمایشگاهی

دارد.

هیچ نوترکیبی مشخصی در بررسی ناحیه CP-UTR جدایه‌های ایرانی NLV در مقایسه با سایر جدایه‌های دنیا تشخیص داده نشد. رابطه تبارزایی جدایه‌های ویروس نهفته نرگس براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR در شکل ۲ مشاهده می شود. مطالعات تبارزایی نشان داد که ۲۷ جدایه این ویروس در دو گروه اصلی جدا از هم (I, II) قرار گرفته و جدایه‌های ایران در کنار جدایه‌های نیوزیلند، بریتانیا و لهستان در گروه II قرار می‌گیرند. گروه I که شامل جدایه‌هایی از کشورهای اروپایی، شرق آسیا و استرالیا می‌باشد، به زیرگروههایی تقسیم شده است. زیرگروه IA شامل جدایه‌هایی از لهستان، هلند، بریتانیا و استرالیا می‌باشد. زیرگروه‌های IB و IC به ترتیب شامل جدایه‌هایی از لهستان و ژاپن می‌باشند. همچنین یک جدایه از چین در زیرگروه ID قرار می‌گیرد. مشابهت نوکلئوتیدی در درون جدایه‌های گروه I بین ۹۶/۶۲٪ تا ۱۰۰ درصد و در درون جدایه‌های گروه II بین ۹۷ تا ۹۹/۹ درصد بود. میزان مشابهت نوکلئوتیدی بین این دو گروه ۷۷ تا ۷۹٪ محاسبه گردید.



شکل ۲- درخت تبارزایی که رابطه جدایه‌های ایرانی ویروس NLV را با سایر جدایه‌های دنیا نشان می‌دهد. این دندروگرام براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR با روش Neighbor-joining در نرم‌افزار MEGA11 ترسیم شده است. اعداد روی شاخه ها نمایانگر درصد bootstrapping (براساس ۱۰۰۰ تکرار) هرکدام از آنهاست که گروهبندی را تایید می کند. مقادیر bootstrap کمتر از ۵۰ درصد فشرده شده‌اند. جدایه‌ها روی درخت براساس نام جدایه (شماره دسترسی، نام جدایه، میزبان و کشور منشا) مشخص شده‌اند. جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه علامت‌دار شده‌اند. ویروس نهفته آرتیشو (KF155694؛ Artichoke latent virus) به عنوان عضو برون‌گروه (Outgroup) استفاده شده است. در سمت راست پلات رنگی مقایسات دو به دوی جدایه های NLV به منظور محاسبه درصد تشابه نوکلئوتیدی نشان داده شده است.

Figure 2- Phylogenetic tree illustrating the relationships of Iranian NLV with other NLV sequences deposited in the GenBank. The dendrogram was generated using the neighbor- joining method by MEGA11 from multiple alignment of CP-UTR sequences. The number of each branch indicates the percentage of bootstraps, which supports the grouping. Bootstrap values less than 50 were condensed. Isolates are indicated in the tree by isolate name (accession number, isolate name, host, and geographical origin of collection). Artichoke latent virus was used as an outgroup in this study. Two-dimensional pair wise sequence identity color plot of the NLV isolates was shown at right.

تنـوع نوکلئوتیـدی و متوسـط تعـداد تفـاوت‌هـای نوکلئوتیـدی (Average number of nucleotide differences) در بین تمـامی جدایه‌ها به ترتیب برابر ۰/۱۳۰ و ۹۳/۲۹۶ بود. میانگین فاصله ژنتیکی که میزان تنوع ژنتیکی را مشخص می‌کنـد بـرای تمـام جدایـه‌هـای NLV برابر با ۰/۱۵ محاسبه گردید. میـزان فاصـله ژنتیکـی بـین دو گروه (۰/۲۶۷) بطور قابل توجهی بیشتر از میزان فاصله ژنتیکی درون هریک از گروه‌ها (۰/۰۲) بـود، کـه تاییـدی بـر صـحت گـروه‌بنـدی تبارزایی است. مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانـه تـوالی نوکلئوتیـدی و آمینواسیدی هر یک از جدایه‌های شناسایی شـده در ایـن مطالعـه بـا سایر جدایه‌های موجود در دنیا نشان داد که بین دندروگرام تبـارزایی و شـباهت نوکلئوتیـدی جدایـه‌هـا همخـوانی وجـود دارد. در سـطح نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی کمترین شباهت را با جدایه‌های گـروه I (بین ۷۷/۴۷٪ تا ۷۹/۱۳٪) و بیشترین شباهت را با جدایه‌های گروه II (بین ۹۷/۲۸٪ تا ۹۸/۱۲٪) داشـتند. جدایـه NLV3 (JX270762) از لهستان کمترین میـزان شـباهت (بـین ۷۷/۴۷ تـا ۷۷/۹۵٪) و جدایـه NLV5_1 (JX270766) از لهستان بیشترین میـزان شـباهت (بـین ۹۷/۶۵ تـا ۹۸/۱۲٪) را بـا جدایـه‌هـای ایرانـی نشـان داد. در سـطح آمینواسیدی جدایه‌های ایرانی کمترین شباهت را با جدایـه NLV5_7 (JX270764) از لهسـتان (بـین ۷۷/۷۰٪ تـا ۷۸/۳۶٪) و بیشـترین شباهت را با جدایه NL1_14 (JN662383) از لهستان (بین ۹۸/۳۶٪ تا ۹۹/۳۴٪) داشتند. همچنین تشابه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسـیدی سه جدایه ایرانی بـا یکـدیگر بـه ترتیـب بـین ۹۷/۸۴–۹۷ و ۹۹/۰۲–۹۷/۳۸ درصـــد تعیـــین گردیـــد. نســـبت جانشـــینی نـــامترادف (Nonsynonymous substitution) بـــر جانشـــینی متـــرادف (Synonymous substitution) در آمینواسیدها کـه بـا علامـت ω نشان می دهند، تخمین مناسبی از فشار انتخاب در سطح پروتئین بـه دست می دهد (Moradi *et al.*, 2018). در بررسی ناحیـه ژنـی CP تمام جدایه‌های NLV، جانشینی متـرادف (dS= 0.551) نسـبت بـه جانشینی نامترادف (dN=0.059) بیشتر بوده و نسبت dN/dS کمتر از یک بود (dN/dS= 0.107) که این نشان‌دهنده حفاظت‌شدگی بـالای پروتئین CP در سطح آمینواسیدی و نقش موثر انتخاب منفی در تنـوع و تکامل این ویروس می‌باشد (Moradi *et al.*, 2018).

در آنالیز تبارزایی و با مقایسه درصد مشابهت ژنتیکی مشخص شد که قرابت تبـارزایی (همگـروه شـدن) بعضـی از جدایـه‌هـا از منـاطق مختلف جهان با یکدیگر انطباقی با قرابت جغرافیایی ندارنـد. بـه نظر می رسد این موضوع به دلیل تکثیر غیرجنسی زنبق و انتشار ویـروس با اندام‌های غیرجنسی گیاه باشد. باتوجه به اینکـه زنبـق‌هـا عمـدتاً از اندام‌های تکثیر رویشی مانند پیازها یا ریـزوم‌هـای خزنـده کـه منبـع مهمی برای ویـروس هسـتند تکثیـر مـی شـوند (Van der Vlugt, 1994)، لذا برای جلوگیری از گسترش این ویـروس، شناسـایی آن در اندام‌های تکثیری گیاه قبل از کاشت ضـروری اسـت. در نمونـه‌هـای مورد بررسی در این پژوهش، مطـابق تحقیقـات ناصـری و همکـاران (Naseri *et al.*, 2022) حضور پـوتی‌ویـروس‌هـایی مثـل ISMV و IMMV که مهمترین و اصلی‌ترین عامل بیماری موزاییـک زنبـق در دنیا هستند نیز محرز شده بود. بنابراین تعیین آلودگی مخلوط NLV با این پوتی ویروس‌ها، از لحاظ به وجـود آمـدن هـم‌افزایـی و خسـارت مضاعف توسط این ویـروس‌هـا در کشـاورزی مهـم اسـت. از ایـن‌رو پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در زمینه شناسایی بیشتر سویه‌هـا و استرین‌های ویروس نهفته نرگس و تنوع ژنتیکی آن در یک منطقه و برهمکنش آن‌ها با دیگر ویروس‌ها صورت گیرد. همانطور کـه اشـاره شد NLV در طبیعت توسط شته‌ها بصورت ناپایا نیز منتقل مـی‌شـود، ولی کنترل مستقیم آن با مواد شیمیایی و یا کنتـرل شـته‌هـای ناقـل تاثیر چندانی ندارد، ضمن اینکه در گیاهان دارویـی اسـتفاده از سـموم شیمیایی علیه ویروس‌ها و ناقلین آن‌ها مورد قبـول نیسـت. از ایـن‌رو کشت ارقام مقاوم و استفاده از اندام‌هـای تکثیـری عـاری از ویـروس مؤثرترین راه کنترل آنهـا مـی‌باشـد. بـا توجـه بـه اینکـه وجـود ایـن ویروس‌ها در مناطق کشت گیاهان نرگس و زنبق تهدیدی برای ایـن گیاهان از نظر اقتصادی محسوب می‌شود، از اینرو تشخیص بـه‌موقـع آلودگی، شناسایی این ویروس‌ها در اندام‌های تکثیری و روابـط آن‌هـا با یکدیگر و اطلاعات مربوط به علائم و خصوصیات عامـل بیمـاری‌زا به پیشگیری از این بیماری کمک می‌کند.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی سـاری (کـد طـرح 01-1401-04) و دانشـگاه فردوسـی مشـهد (کـد طـرح 48648) بدلیل حمایت از انجام پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

1. Adams, M.J., Antoniw, J.F., & Fauquet C.M. (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology* 150: 459–479. https://doi.org/10.1007/s00705-004-0440-6.
2. Asjes, C.J. (1979). Viruses and virus diseases in Dutch bulbous irises (*Iris hollandica*) in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 85: 269–279.
3. Attari, S., Shoor, M., Ghorbanzadeh Neghab, M., Tehranifar, A., & Malekzadeh Shafaroudi, S. (2016). Evaluation

of genetic diversity of iris genotypes (*Iris* spp.) Using ISSR. *Journal of Horticultural Science 30*(3): 376-382. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v30i3.28044.

4. Atreya, C.D., Raccah, B., & Pirone, T.P. (1990). A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 178: 161–165. https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90389-9.
5. Atreya, P.L., Lopez-Moya, J.J., Chu, M., Atreya, C.D., & Pirone, T.P. (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology* 76: 265–270. https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-2-265.
6. Ateka, E., Alicai, T., Ndunguru, J., Tairo, F., Sseruwagi, P., Kiarie, S., Makori, T., Kehoe, M.A., & Boykin, L.M. (2017). Unusual occurrence of a DAG motif in the Ipomovirus Cassava brown streak virus and implications for its vector transmission. *PLoS One* 12: e0187883. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187883.
7. Badge, J., Robinson, D.J., Brunt, A.A., & Foster, G.D. (1997). 3′-Terminal sequences of the RNA genomes of narcissus latent and maclura mosaic viruses suggest that they represent a new genus of the *Potyviridae*. *Journal of General Virology* 78: 253-257. https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-1-253.
8. Barnett, O.W. (1991). *Iris fulva mosaic virus*, AAB Descriptions of Plant Viruses No. 310. Association of Applied Biologists, Wellesbourne.
9. Barnett, O.W., & Alper, M. (1977). Characterization of *Iris fulva mosaic virus*. *Phytopathology* 67: 448–454. https://doi.org/10.1094/Phyto-67-448.
10. Berger, P.H., Wyatt, S.D., Shiel, P.J., Silbernagel, M.J., & Druffel, K. (1997). Phylogenetic analysis of the *Potyviridae* with emphasis on legume-infecting potyviruses. *Archives of Virology* 142: 1979±1999. https://doi.org/10.1007/s007050050216.
11. Berniak, H., Komorowska, B., & Sochacki, D. (2013). Detection of Narcissus latent virus isolates using one-step RT-PCR assay. *Journal of Horticultural Research* 21: 11–14. https://doi.org/10.2478/johr-2013-0002.
12. Brunt, A.A., & Atkey, P.T. (1967). *Rapid detection of narcissus yellow stripe and two other filamentous viruses in crude negatively- stained narcissus sap*. Report of the Glasshouse Crops Research Institute for 1966, pp. 155-159.
13. Brunt, A.A. (1977). Some hosts and properties of narcissus latent virus, a carlavirus commonly infecting narcissus and bulbous iris. *Annals of Applied Biology* 87: 355-364. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1977.tb01900.x.
14. Chen, J., Shi, Y.H., Li, M.Y., Adams, M.J., & Chen, J.P. (2008). A new potyvirus from butterfly flower (*Iris japonica* Thunb.) in Zhejiang, China. *Archives of Virology* 153: 567–569. https://doi.org/10.1007/s00705-007-0014-5.
15. Clark, V.R., & Guy, P.L. (2000). Five viruses in *Narcissus* spp. plants from New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 29: 227-229. https://doi.org/10.1071/AP00044.
16. Derks, A.F.L.M., Hollinger, T.H.C., & Vink-van den Abeele, J.L. (1985). Identification and symptom expression of four elongated viruses infecting bulbous irises. *Acta Horticulturae* 164: 309-318.
17. Farahbakhsh, F., Masumi, M., Afsharifar, A.R., Izadpanah, K., & Rahpeyma Sarvestani, N. (2013). Genetic variation of Bermuda grass southern mosaic virus isolates based on sequence of 3’ region of genome. *Iranian Journal of Plant Pathology 49*(1): 61-75. (In Persian with English abstract)
18. Flasinski, S., & Cassidy, B.G. (1998). Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. *Archives of Virology* 143: 2159±72. https://doi.org/10.1007/s007050050449.
19. Gao, F., Shen, J., Liao, F., Cai, W., Lin, S., Yang, H., & Chen, S. (2018). The first complete genome sequence of narcissus latent virus from Narcissus. *Archives of Virology 163*(5): 1383-1386. https://doi.org/10.1007/s00705-018-3741-x.
20. Hammond, J., Derks, A.F.L.M., Barnett, O.W., Lawson, R.H., Brunt, A.A., Inouye, N., & Allen, T.C. (1985). Viruses infecting bulbous iris: a clarification of nomenclature. *ISHS Acta Horticulturae* 164: 395–397.
21. Inouye, N., & Mitsuhata, K. (1978). Turnip mosaic virus isolated from Iris. *Nogaku Kenkyu* 57: 1–16. (In Japanese with English abstract)
22. Jin, J., Shen, J.G., Cai, W., Xie, G.H., Liao, F.R., Gao, F.L., Ma, J.F., Chen, X.H., & Wu, Z.J. (2017). Narcissus yellow stripe virus and narcissus mosaic virus detection in Narcissus via multiplex TaqMan-based reverse transcription-PCR assay. *Journal of Applied Microbiology* 122: 1299–1309. https://doi.org/10.1111/jam.13422.
23. Johansen, I.E., Keller, K.E., Dougherty, W.G., & Hampton, R.O. (1996). Biological and molecular properties of a pathotype P-1 and a pathotype P-4 isolate of pea seed-borne mosaic virus. *Journal of General Virology* 77: 1329–1333. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-6-1329.
24. King, A.M., Lefkowitz, E., Adams, M.J., & Carstens, E.B. (2012). *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam. pp 1272. ISBN: 978-0-12-384684-6.
25. Kulshrestha, S., Hallan, V., Raikhy, G., Ram, R., Zaidi, A.A., & Garg, I.D. (2006a). Incidence of *Bean yellow mosaic virus* on Iris. *Acta Horticulturae* 722: 235–240. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.722.29.
26. Kulshrestha, S., Hallan, V., Raikhy, G., Ram, R., Garg, I.D., Haq, Q.M.R., & Zaidi, A.A. (2006b). Occurrence of iris mild mosaic potyvirus in cultivated iris in India. *Indian Journal of Biotechnology* 5: 94–98.

27. Lopez-Moya, J.J., Wang, R.Y., & Pirone, T.P. (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *Journal of General Virology* 80 (Pt 12): 3281±8. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-12-3281.
28. Moradi, Z., Mehrvar, M., Nazifi, E., & Zakiaghl, M. (2017a). Identification and molecular analysis of sugarcane mosaic virus (SCMV) in Mazandaran province. *Journal of Iranian Plant Protection Research 30*(4): 639-645. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.v30i4.50484.
29. Moradi, Z., Mehrvar, M., Nazifi, E., & Zakiaghl, M. (2017b). Iranian johnsongrass mosaic virus: the complete genome sequence, molecular and biological characterization, and comparison of coat protein gene sequences. *Virus Genes* 53: 77-88. https://doi.org/10.1007/s11262-016-1389-8.
30. Moradi, Z., Mehrvar, M., & Nazifi, E. (2018). Genetic diversity and biological characterization of sugarcane streak mosaic virus isolates from Iran. *VirusDisease* 29: 316–323. https://doi.org/10.1007/s13337-018-0461-5.
31. Moradi, Z., & Mehrvar, M. (2022). First report of Narcissus latent virus infecting iris in Iran. *New Disease Reports 46*(1): e12114. https://doi.org/10.1002/ndr2.12114.
32. Naseri, A., Moradi, Z., Mehrvar, M., & Zakiaghl, M. (2022) Genomic characterization and phylogenetic analysis of two potyviruses infecting iris in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology 24*(5): 1233-1249.
33. Nigam, D., LaTourrette, K., Souza, P.F.N., & Garcia-Ruiz, H. (2019). Genome wide variation in potyviruses. *Frontiers in Plant Science* 10: 1439. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01439.
34. Ohshima, K., Nomiyama, R., Mitoma, S., Honda Y., Yasaka, R., & Tomimura, K. (2016). Evolutionary rates and genetic diversities of mixed potyviruses in Narcissus. Infection. *Genetics and Evolution* 45: 213–223. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.036.
35. Rahmana, A., Nasima, S., Baig, I., Jalil, S., Orhan, I., Sener, B., & Choudhary, M.I. (2003). Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of Iris germanica. *Journal of Ethnopharmacology* 86: 177-180. https://doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00055-2.
36. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120.
37. Van der Vlugt, C.I.M., Derks, A.F.L.M., Boonekamp, P.M., & Goldbach, R.W. (1993). Improved detection of Iris severe mosaic virus in secondarily infected iris bulbs. *Annals of Applied Biology* 122: 279–288. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04033.x.
38. Van der Vlugt, C.I.M. (1994). *Distribution and multiplication of iris severe mosaic potyvirus in bulbous Iris in relation to metabolic activity: implications for ISMV detection*, Ph.D. thesis. Bulb Research Centre Lisse, Dutch Flower Bulb Industry, The Netherlands.
39. Wei, T., Pearson, M.N., & Cohen, D. (2006). First report of ornithogalum mosaic virus and ornithogalum virus 2 in New Zealand. *Plant Pathology* 55: 820. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01375.x.
40. Wei, T., Pearson, M.N., & Cohen, D. (2007). First report of narcissus latent virus in New Zealand. *Plant Pathology* 56: 720. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01579.x.
41. Wylie, S.J., Kueh, J., Welsh, B., Smith, L.J., Jones, M.G.K., & Jones, R.A.C. (2002). A non-aphid-transmissible isolate of bean yellow mosaic potyvirus has an altered NAG motif in its coat protein. *Archives of Virology* 147: 1813–1820. https://doi.org/10.1007/s00705-002-0846-y.
42. Wylie, S.J., & Jones, M.G.K. (2012). Complete genome sequences of seven carlavirus and potyvirus isolates from Narcissus and Hippeastrum plants in Australia, and proposals to clarify their naming. *Archives of Virology* 157: 1471–1480. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1319-6.
43. Wylie, S.J., Tran, T.T., Nguyen, D.Q., Koh, S.H., Chakraborty, A., Xu, W., Jones, M.G.K., & Li, H. (2019). A virome from ornamental flowers in an Australian rural town. *Archives of Virology* 164: 2255–2263. https://doi.org/10.1007/s00705-019-04317-7.